

Pathomorphogenese experimenteller Verkalkungen in der weiblichen Brustdrüse

Ein Beitrag zur Kenntnis der Calciphylaxie

G. BRANDT und R. BÄSSLER

Pathologisches Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Bredt)

Eingegangen am 12. Juli 1969

Pathomorphogenesis of Experimental Calcification in the Female Mammary Gland

A Contribution to Calciphylaxis

Summary. In histological studies of pathological changes of the human breast calcification was found in the retained secretion, in the epithelium, and in the stroma of the gland. Since the pathomorphogenesis of these calcifications is unknown, pathogenetic factors contributing to the calcification of the mammary gland were studied in experiments. The model of calciphylaxis (Selye) was used for the study. Tests were carried out in 70 Sprague-Dawley-rats. The calcium metabolism was increased by oral application of 1 mg dihydrotachysterol (sensitizer) on the first day of the test. As a second factor (challenger) experimental retention of milk was produced by ligation of some mamillae. In another experimental group, after application of dihydrotachysterol, a metabolic damage of cells was effected by intraperitoneal injection of ethionine (2% watery solution). Complete dosage of ethionine: 400—800 mg per kg animal. Histochemical proof of calcium deposits were obtained with the methods of Voigt and V. Kossa.

Results. 1. Dihydrotachysterol increases the secretory activity in the mammary gland of lactating rats and augments the calcium content of the secretion. Application of ethionine alone causes a greater precipitation of calcium in the secretion of the gland than in normal lactating animals. 2. The mechanical calciphylactic reaction produced by ligating the mamillae is characterized by the precipitation of calcium in the secretion retained in the lumen of the glands. 3. Metabolic calciphylaxis produced by ethionine causes an increase of calcium in the secretion of the glands. It leads to intraepithelial and interlobular calcification of interstitial tissue, the latter exceeds the former. 4. The formal pathogenesis of the two types of calcification is demonstrated and compared with calcifications already known in the human mammary gland.

Zusammenfassung. Vergleichende pathohistologische Untersuchungen an Brustdrüsen des Menschen haben ergeben, daß Kalkablagerungen in retiniertem Drüsensekret, in Epithelzellen und im Stroma auftreten können. Die Pathomorphogenese dieser Gewebsverkalkungen ist weitgehend ungeklärt. Durch experimentelle Untersuchungen sollen pathogenetische Faktoren für die intramammäre Verkalkung aufgezeigt werden. Für das Studium extraossärer Gewebsverkalkungen diente das Modell der Calciphylaxie nach Selye. Die Untersuchungen wurden an 70 Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Mobilisation des Calciumstoffwechsels erfolgte durch einmalige perorale Applikation von 1 mg Dihydrotachysterin (Sensitizer) am 1. Versuchstag. Als zweiter Faktor (Challenger) wurde in einer Versuchsgruppe am 2. Versuchstag durch Ligatur der Zitzen eine experimentelle Milchstauung gesetzt. In einer 2. Versuchsgruppe wurde nach Applikation von Dihydrotachysterin eine metabolische Zellschädigung durch Äthionin (α -Amino- γ -äthylmercaptobuttersäure) durch intraperitoneale Injektion in 2%iger wäßriger Lösung ausgelöst. Gesamtdosis an Äthionin: 400—800 mg/kg Tier. Histochemischer Kalknachweis nach Voigt und v. Kossa.

Ergebnisse. 1. Dihydrotachysterin bewirkt bei lactierenden Ratten eine Steigerung der sekretorischen Aktivität mit Anreicherung von Calcium im Sekret. Auch unter Äthioninwirkung werden stärkere Kalkniederschläge im Drüsensekret beobachtet als bei lactierenden

Kontrolltieren. 2. Bei der durch mechanische Sekretstauung hervorgerufenen calciphylaktischen Reaktion ist die Kalkablagerung überwiegend im retinierten Sekret des Drüsenlumens lokalisiert. 3. Bei metabolischer, durch Äthionin bedingter Calciphylaxie entwickelt sich eine Calciumvermehrung im Drüsensekret, eine intraepitheliale und eine quantitativ überwiegende interlobuläre Verkalkung des Mesenchyms. 4. Die formale Pathogenese beider Verkalkungstypen wird aufgezeigt und bekannten Calcifikationen in der Brustdrüse des Menschen gegenübergestellt.

Die in der Brustdrüse des Menschen, insbesondere in Tumoren, bei fibrös-cystischer Mastopathie oder in retiniertem Sekret auftretenden granulären oder scholligen Kalkablagerungen sind in der Histopathologie der weiblichen Mamma seit langem bekannt (Schultz-Brauns, 1933; Geschickter, 1945). Durch Anwendung der Mammographie haben diese Verkalkungen zunehmende diagnostische Bedeutung erlangt, so daß röntgenologisch erfaßbare, spritzerartige Calcifikationen in einem Brustdrüsenkörper als wichtiges Kriterium für das Vorliegen eines Carcinoms gelten (Gershon-Cohen, Yiu und Berger, 1962). Angaben über die Häufigkeit von Verkalkungen in malignen Tumoren der Mamma sind allerdings unterschiedlich: Egan (1960) stellte in 40% Kalkherde fest; Levitan, Witten und Harrison (1964) in 29%; Black und Young (1965) in 39%; Friedmann, Askovitz und Berger (1966) in 24%; Buchwald (1968) in 43%. — Bei röntgenologischer Untersuchung von Tumorstücken, die zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet worden waren, fanden Shepard, Crile und Strittmatter (1962) sogar in 75% Kalkablagerungen. Dagegen weisen benigne Geschwülste nur in 6% Abscheidungen von Kalksalzen auf.

Das morphologisch wechselhafte Verkalkungsmuster in der Mamma, Ausmaß und Topik der Ablagerungen in Drüsenalveolen, Milchgängen, Epithelzellen sowie im Mantel- oder Stützgewebe sind in ihrer Pathogenese noch weitgehend ungeklärt und auch experimentell bisher nicht untersucht worden. Neue Ergebnisse können daher durch das Studium der experimentellen extraossären Gewebsverkalkung mit dem Wirkungsprinzip der Calciphylaxie von Selye (1962) erwartet werden.

Bei der calciphylaktischen Reaktion mobilisiert ein „Sensitizer“ (Calcinosefaktoren wie Dihydrotachysterin [DHT], Vitamin D) den Calciumstoffwechsel. Der innerhalb einer „kritischen Zeitperiode“ einwirkende zweite Faktor, der „Challenger“, verändert je nach den Versuchsbedingungen chemisch oder physikalisch das Receptorgewebe in der Weise, daß lokalisierbare Verkalkungen möglich werden. Mit diesem Modell wird daher versucht, experimentell die Formen intramammärer Verkalkungen nachzuahmen, woraus sich folgende Fragen ergeben:

1. Ist es möglich, calciphylaktische Reaktionen in der Mamma auszulösen?
2. Können verschiedene Verkalkungstypen experimentell erzeugt werden?
3. Erlauben die experimentell gewonnenen Ergebnisse eine Deutung der Verkalkungstypen in der Brustdrüse des Menschen?

Material und Methoden

Die Versuche wurden an 70 weiblichen, lactierenden Sprague-Dawley-Ratten einer Mainzer Tierzuchtanstalt durchgeführt. Die Tiere befanden sich im 1. oder 2. Fortpflanzungszyklus. Durchschnittsgewicht 270 g. Wenige Tage vor dem Werfen wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Fütterung durch Standardfutter (Hauna, Fa. Brückenmühle, Hünfeld), Trinkwasser ad libitum. — Größe des Wurfes: 8—9 Jungtiere.

Als *Sensitizer* diente AT 10 (kristall. Dihydrotachysterin in ölgiger Lösung, Fa. Bayer und Merck). Dosierung: 1 mg/100 g Körpergewicht Ratte; Applikation: peroral durch Schlucksonde. Als *Challenger* wurden zwei Wirkungsprinzipien angewandt: 1. Mechanische Sekretstauung durch Ligatur der Zitzen. 2. Metabolische Schädigung der Epithelzellen durch Äthionin (α -Amino- γ -äthylmercaptobuttersäure, Fa. Schuchardt, München). Applikation: Intraperitoneale Injektion einer 2%igen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung mit pH 7.

1. *Vorversuche* zur Bestimmung des Serumcalciumspiegels unter Dihydrotachysterin (DHT) wurden an 18 juvenilen Sprague-Dawley-Ratten mit Körpergewicht von 95–110 g vorgenommen. Die Tiere erhielten Standardfutter und Trinkwasser ad libitum. 1 mg DHT wurde durch Schlucksonde verabreicht. Je 2 vorbehandelte Tiere wurden am 1., 2., 3., 4., 5., 7., 9., 11. und 13. Versuchstag durch Entbluten getötet. Das Blutserum wurde flammenphotometrisch auf seinen Calciumgehalt untersucht¹ (Abb. 1).

2. Versuchsgruppe: 8 Kontrolltiere (normale Lactation).

3. Versuchsgruppe: 8 lactierende Ratten, 3. Tag post partum (p.p.) DHT. Sektion 5.–15. Tag p.p.

4. Versuchsgruppe: 8 lactierende Ratten, 3. Tag p.p. DHT. 3–6 Std später Abbinden der rechten thorakalen und abdominalen Mamillen in Äthernarkose. Sektion 10.–25. Tag p.p.

5. Versuchsgruppe: 8 lactierende Ratten. Am 3. und 4. Tag p.p. insgesamt 0,8 g Äthionin pro 100 g Ratte.

6. Versuchsgruppe: 22 lactierende Ratten, 3. Tag p.p. DHT. 8 Tiere: 4.–5. Tag p.p. je 0,2 g Äthionin pro 100 g Ratte sog. niedrige Dosis. 6 Tiere: 4.–7. Tag p.p. je 0,2 g Äthionin pro 100 g Ratte sog. mittlere Dosis. 8 Tiere: 4. Tag p.p. morgens und abends je 0,4 g Äthionin pro 100 g Ratte; sog. hohe Dosis. Sektion: 6.–20. Tag p.p.

Für die histologischen Untersuchungen wurden Teile der Brustdrüsen abpräpariert und in Formalin und in 70%igem Alkohol fixiert. Einbettung in Paraffin, Färbung mit HE, van Gieson, PAS. Kalknachweis nach v. Kossa (1901) und nach Voigt (1957). Diese für Calcium spezifische Methode beruht auf einer Reaktion von freiem Calcium mit Naphthalhydroxamsäure. Nachweis des Calciums erfolgt im halb- oder vollpolarisierten Licht in Form rhomboider, doppelbrechender Kristalle.

Ergebnisse

1. Der Einfluß von DHT auf den Serumcalciumspiegel und die unspezifische Organcalcinose

Für die Beurteilung calciphylaktischer Reaktionen ist in Vorversuchen die zeitliche Veränderung des Serumcalciumspiegels nach einmaliger Gabe von 1 mg DHT pro 100 g Körpergewicht Ratte bestimmt worden. In Übereinstimmung mit Jean und Mendell (1962) sowie Moss und Urist (1964) steigt das Serumcalcium bis zum 3. Tag nach DHT-Applikation steil an. In den folgenden 10 Tagen kehrt der Calciumspiegel zur Norm zurück. Die einmalige DHT-Gabe löst demnach eine etwa 10 Tage anhaltende Hypercalcämie aus (Abb. 1).

Die Versuchstiere zeigten unter DHT-Wirkung kein bemerkenswertes Verhalten. Bei der Obduktion makroskopisch keine auffälligen Veränderungen. — Histologisch war jedoch eine ausgeprägte „unspezifische Calcinose“ (Selye, 1962) festzustellen, die sich bis zum 3./4. Tag ausgebildet hatte und mit Absinken des Serumcalciumspiegels wieder schwand. Der Calciumnachweis von Voigt (1957) ergab diskrete Verkalkungen von Herzmuskelfasern, ferner subintimale Kalkeinlagerungen in den Coronararterien, eine Calcinose des Alveolargerüsts der Lunge, eine Nephrocalcinose mit Kalkcylindern in den Tubuli, eine Verkalkung der Muscularis propria des Magens und Kalkeinlagerungen in den Wänden der Lebersinusoiden. In der schematischen Darstellung Abb. 1 sind Topik, Intensität der Organcalcinose und Serumcalciumspiegel gegenübergestellt.

¹ Herrn Doz. Dr. Prellwitz, II. Med. Univ.-Klinik Mainz, sei für diese Untersuchungen vielmals gedankt.

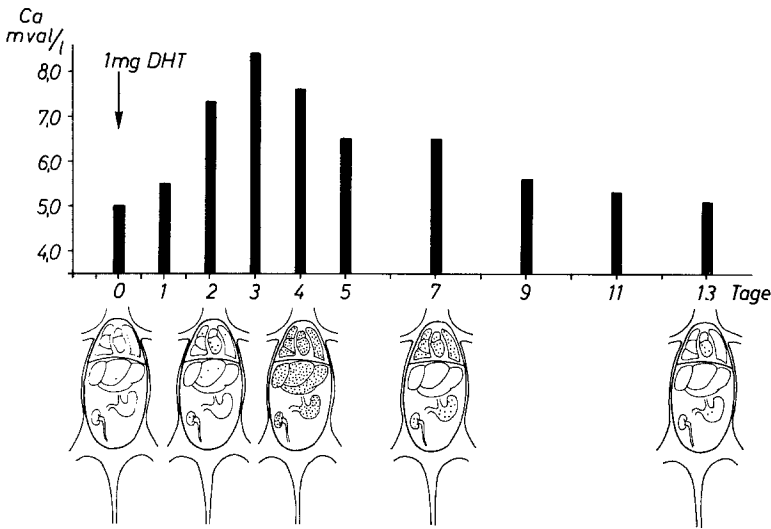


Abb. 1. Gegenüberstellung von Serumcalciumspiegel und unspezifischer Organcalcinose der Ratte. Oben: Serumcalciumspiegel nach DHT (1 mg/100 g). Steiler Anstieg bis zum 3. Tag; allmähliche Rückkehr zur Norm innerhalb von 10 Tagen. Darunter: „Unspezifische Calcinose“ der Versuchstiere. Die ausgeprägtesten Calcifikationen finden sich am 4.—5. Versuchstag in Lunge, Herz, Leber, Magen und Nieren

DHT wird von juvenilen weiblichen Ratten, von Tieren während der Lactation und bei Behandlung mit Geschlechtshormonen unterschiedlich vertragen. Eine einmalige Dosis von 2 mg DHT pro 100 g Körpergewicht Ratte überleben normale weibliche Tiere — allerdings mit starker Allgemeinreaktion, Gewichtsabnahme und Diarrhoe. Lactierende Ratten zeigen schon nach 1 mg DHT pro 100 g Körpergewicht gleiche Erscheinungen und sterben nach 2 mg DHT pro 100 g Körpergewicht. — Besonders sensibel sind juvenile Ratten während einer Oestrogen- und Progesteronbehandlung. Diese Tiere sterben schon nach einmaliger Applikation von 1 mg DHT pro 100 g Körpergewicht, so daß nur jeweils die Hälfte dieser Dosierung verabreicht werden kann. Die Ergebnisse über Wirkungen von DHT an der hormonal proliferierten Mamma werden an anderer Stelle mitgeteilt.

2. Der histochemische Calciumnachweis in der Mamma lactierender Ratten (Versuchsgruppe 2)

Die für Calcium spezifische Gewebsreaktion nach Voigt ergibt in der Mamma lactierender Ratten unterschiedliche Befunde, die vom Füllungsgrad der Alveolen und damit vom Caseingehalt abhängen (Abb. 2a). Regelmäßig ist in Alveolen bei Sekretretention der Calciumgehalt hoch und häufig auch in den Epithelzellen erfaßbar (Abb. 4a). Im Interstitium der lactierenden Mamma sind zwischen 3. und 18. Tag post partum vereinzelt doppelbrechende Calciumkristalle zu sehen.

3. Die Wirkung von DHT auf die lactierende Mamma (Versuchsgruppe 3)

Die Tiere zeigen mehrere Tage lang Freßunlust, Gewichtsabnahme, struppiges Fell und Conjunctivitis. Bei der Sektion findet sich eine unspezifische Calcinose (Selye, 1962) in Lunge, Magen, Herz und Nieren.

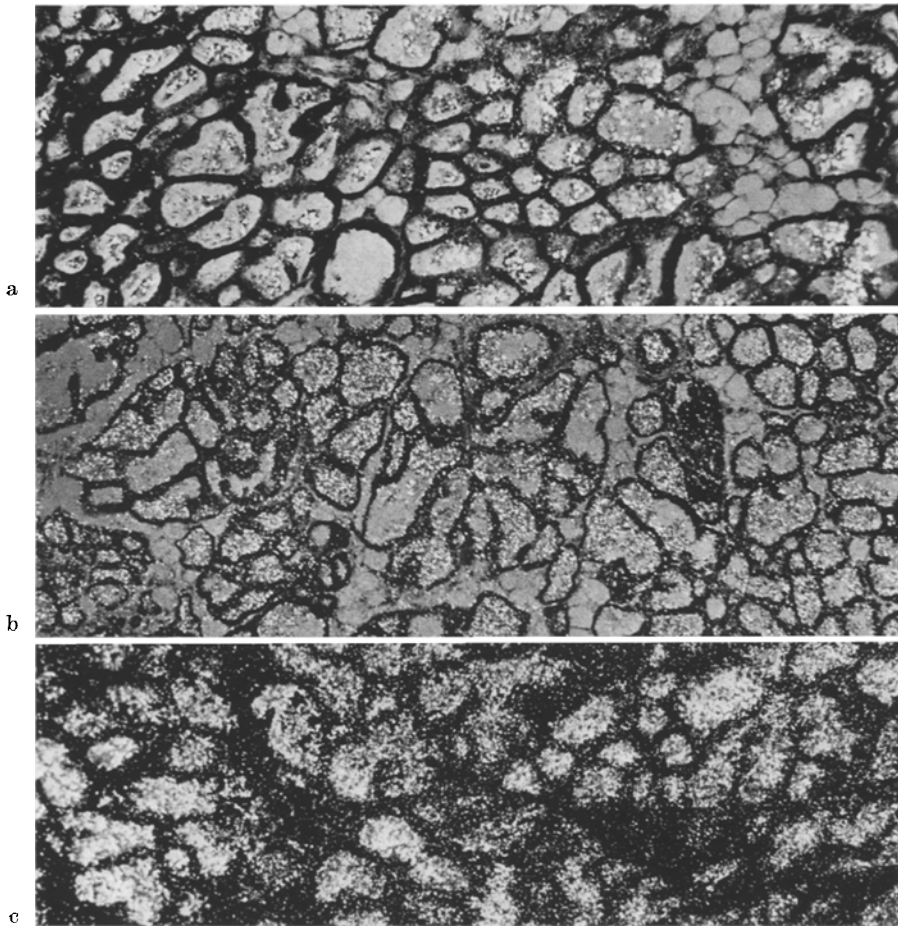


Abb. 2 a—c. Wirkung von DHT auf die lactierende Mamma. a Normal lactierende Mamma: In erweiterten Alveolen herdförmig Calcium angereichert, Voigt-halbpolarisiert. b Ektatische Alveolen nach kurzdauernder DHT-Einwirkung mit vermehrtem Calciumgehalt des Sekretes, Voigt-halbpolarisiert. c Von Kalk erfüllte Alveolen nach längerer DHT-Einwirkung. In Epithel und Interstitium nur wenig „Calciumkristalle“, Voigt-vollpolarisiert (Alkohol-Fix., Paraff., Vergr. 70×)

Mamma. Makroskopisch sind keine Unterschiede zu den normal besaugten Brustdrüsen zu erkennen. Histologisch werden Zeichen lebhafter Sekretion und Sekretretention beobachtet. Der Calciumnachweis ergibt in weit entfalteten Alveolen mit kubischen Epithelien und angedeuteter Spiegelbildung eine intensive Reaktion. Unter Spiegelbildung oder „Absahnen“ versteht man nach Richardson (1948) eine Abtrennung des spezifisch schwereren Milcheiweiß von dem überlagerten Milchfett durch eine scharfe Grenze. Bei Polarisation ist das Drüsenlumen von den gelb aufleuchtenden Kristallen flächenhaft ausgefüllt (Abb. 2b, c). Gegenüber den Kontrolltieren ist regelmäßig vermehrt Calcium im Drüsenlumen erfaßbar (Abb. 2a).

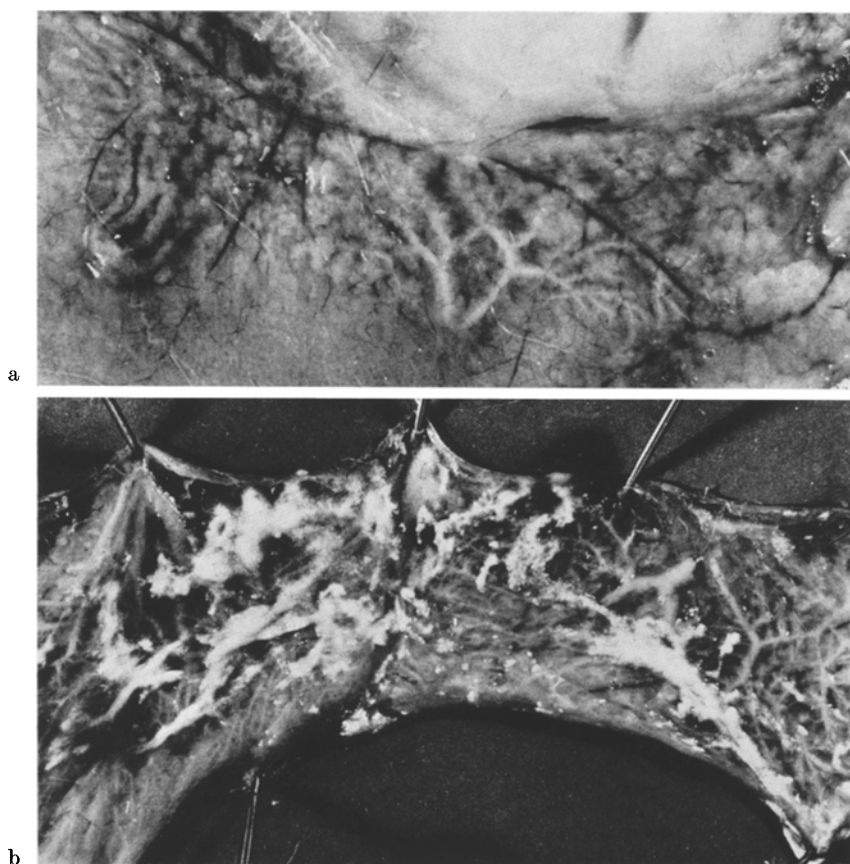


Abb. 3 a u. b. DHT und experimentelle Milchstauung. a Leistenförmig vorspringende, erweiterte Milchgänge zwischen atrophischem Drüsengewebe. b Beim Präparieren der Drüse eröffnete Milchgänge enthalten verkalktes weißes Sekret

4. Calciphylaktische Reaktion nach DHT und experimenteller Milchstauung (Versuchsgruppe 4)

Die Allgemeinreaktionen entsprechen denen der Versuchsgruppe 3. Makroskopisch heben sich nach 14tägiger Milchstauung bleistiftminenstark erweiterte Milchgänge von involviertem Drüsengewebe ab. Eröffnete Milchgänge haben einen kalkhaltigen, bröckeligen Inhalt (Abb. 3).

Histologisch finden sich nach kurzdauernder Sekretstauung ähnliche Veränderungen wie bei Versuchsgruppe 3. Bei fortdauernder Stauung sinken die spezifisch schwereren Proteinbestandteile ab und werden von Fetttropfen überlagert (Spiegelbildung). Die Milchgänge und ein Teil der Alveolen erweitern sich. Ihre Epithelien flachen ab. An Stelle der involvierten Drüsenanteile wächst vikariierend Fettgewebe ein. Das interlobuläre Bindegewebe wird durch Faserbildung großkerniger Fibrocyten verbreitert. Die experimentelle Milchstauung bewirkt neben der Sekret-

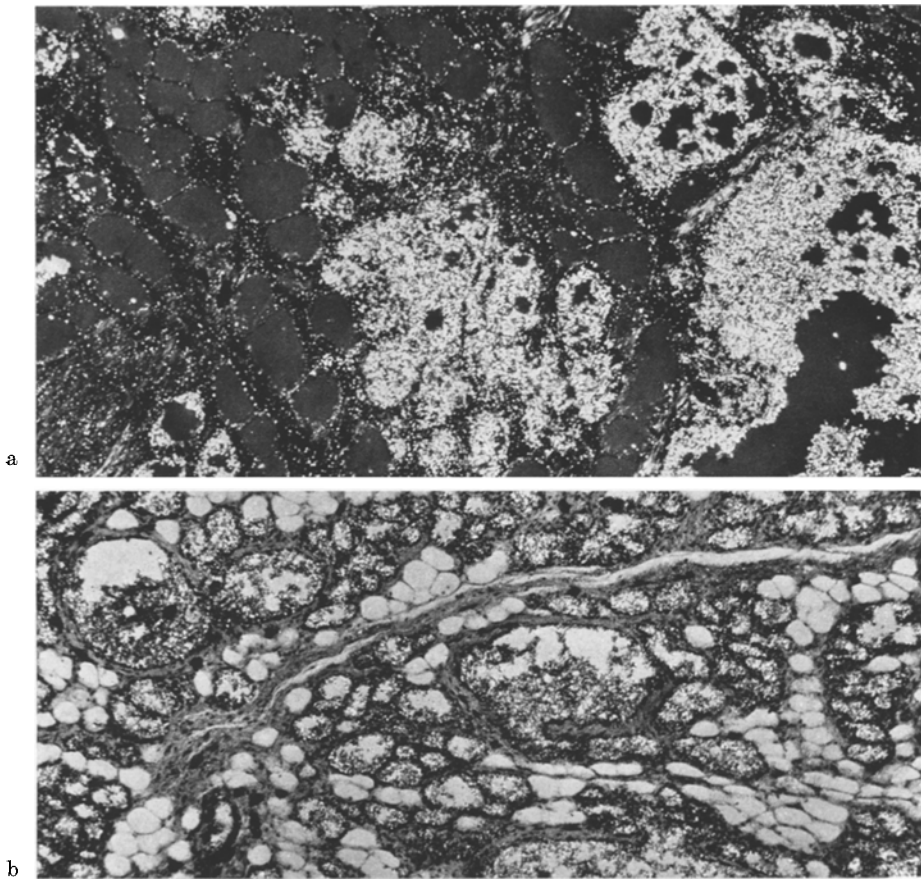


Abb. 4 a u. b. DHT und experimentelle Milchstauung. a Stark erweiterte Milchgänge mit dichter Kalkausfällung im Lumen, Voigt-vollpolarisiert, Vergr. $230\times$. b Verkalkung des Sekretes gestauter Milchgänge und Alveolen zwischen atrophischen Drüsenläppchen und vikariierend einwachsendem Fettgewebe, Voigt-halbpolarisiert, Vergr. $70\times$. (Formol- u. Alkohol-Fix.)

retention mit Ektasie der Milchgänge und eines Teils der Alveolen eine rasche Rückbildung der übrigen Drüsenanteile.

Mit der Zeit entstehen im Epithelverband der gestauten Milchgänge durch Epithelnekrosen breite Lücken, durch die lockeres Bindegewebe einwächst. Vom interlobären Bindegewebe aus wird das gestaute Sekret unter Ausbildung eines Granulationsgewebes mit Fremdkörperriesenzellen resorbiert. — In einem Vorversuch war bei einer Ratte nach 25 Tage andauernder Stauung die Brustdrüse flächenhaft durch Granulationsgewebe ersetzt.

Beim *Calciumnachweis* nach Voigt läßt sich nach kurz dauernder Milchstauung eine gleichmäßige Calciumanreicherung in dem aufgestauten Sekret nachweisen (Abb. 4a). Mit zunehmender Entmischung des Sekretes („Absahnen“) als Zeichen intramammärer Sekretstauung verdichten sich die Calciumansammlungen in den

sedimentierten Sekretbestandteilen, d. h. überwiegend in der caseinreichen Phase. Im Epithel und Interstitium sind nur vereinzelt gelbe „Calciumkristalle“ zu beobachten.

Im Lumen sich zurückbildender Alveolen ist in den Sekretresten nur wenig Calcium erfaßbar. Der Calciumgehalt des Sekretes in den gestauten Milchgängen und Alveolen nimmt mit fortdauernder Stauung zu (Abb. 4 b). Dieser ist kenntlich an einer Zusammenlagerung der gelben Kristalle, wodurch bei der Voigt-Färbung das Sekret tiefbraun gefärbt ist. Teilweise sind im Alveolarlumen schollige, grobe Calcifikationen enthalten.

Stellenweise finden sich diskrete Calcifikationen im interstitiellen Bindegewebe im Bereich involvierender Alveolen. Quantitativ stehen diese interstitiellen Verkalkungen weit hinter den intraalveolären Calciumanreicherungen.

5. Calciumnachweis in der Mamma äthioninbehandelter Ratten (Versuchsgruppe 5)

Innerhalb kurzer Zeit applizierte hohe Dosen Äthionin stören für 4—6 Tage das Allgemeinbefinden: Die Versuchstiere haben struppiges Fell, Fraßunlust und kümmern sich weniger um ihre Jungen. Makroskopisch ergibt die Obduktion keinen von der Norm abweichenden Befund.

Histologisch zeigt die Mamma für wenige Tage Zeichen der Stauung mit Sekretretention und Spiegelbildungen. 5 Tage nach der Äthioningabe ist der Sekretgehalt wieder normal. In normal weiten Alveolen bilden die Epithelien papilläre Epithelhyperplasien aus, die sich in das Lumen vorwölben.

Beim *Calciumnachweis* nach Voigt stellt sich ein erhöhter Calciumgehalt des Drüsensekretes dar; feingranuläre Schwärzungen bei der Kossa-Färbung weisen auf einen erhöhten Phosphatgehalt hin (Abb. 5a). Regelmäßig ist der morphologisch erfaßbare Calciumgehalt des Sekretes gegenüber normal lactierenden Mammæ vermehrt. Im Alveolarepithel und im interstitiellen Bindegewebe ist nur ganz vereinzelt Calcium nachweisbar.

6. Calciphyllaktische Reaktion nach DHT und metabolischer Zellschädigung durch Äthionin (Versuchsgruppe 6)

Die Allgemeinreaktionen der Tiere sind dosisabhängig: Rhinitis und Konjunktivitis, struppiges Fell, Gewichtsreduktion bei Fraßunlust und Durchfall. Die Mortalität ist bei höchster Dosierung am größten: Es sterben von 8 Versuchstieren 5 innerhalb der ersten 10 Versuchstage. Makroskopisch sind die Mammæ bei kurzer Versuchsdauer wenig auffällig, bei längerer Versuchsdauer dosisabhängig verschmälert, trocken und karnös. Im Drüsengewebe fallen punktförmige weiße Calcifikationen auf. Bei längerer Beobachtung findet man schollige Kalkausfällungen zwischen atrophischem Drüsengewebe (Abb. 6a).

Histologisch erhält man je nach Äthionindosis unterschiedliche Bilder: Bei „niedriger Äthionindosierung“ sind die Alveolen weit entfaltet, ihre Epithelien weisen keine Besonderheiten auf. Das Drüsensekret verliert seine homogene Struktur. Die Alveolarlumina sind von großen Fetttropfen erfüllt, zwischen denen netzförmig Casein eingelagert ist. Der Kalknachweis nach Voigt ergibt einen hohen Calciumgehalt des Drüsensekretes. Beim Vergleich mit nur DHT-behandelten

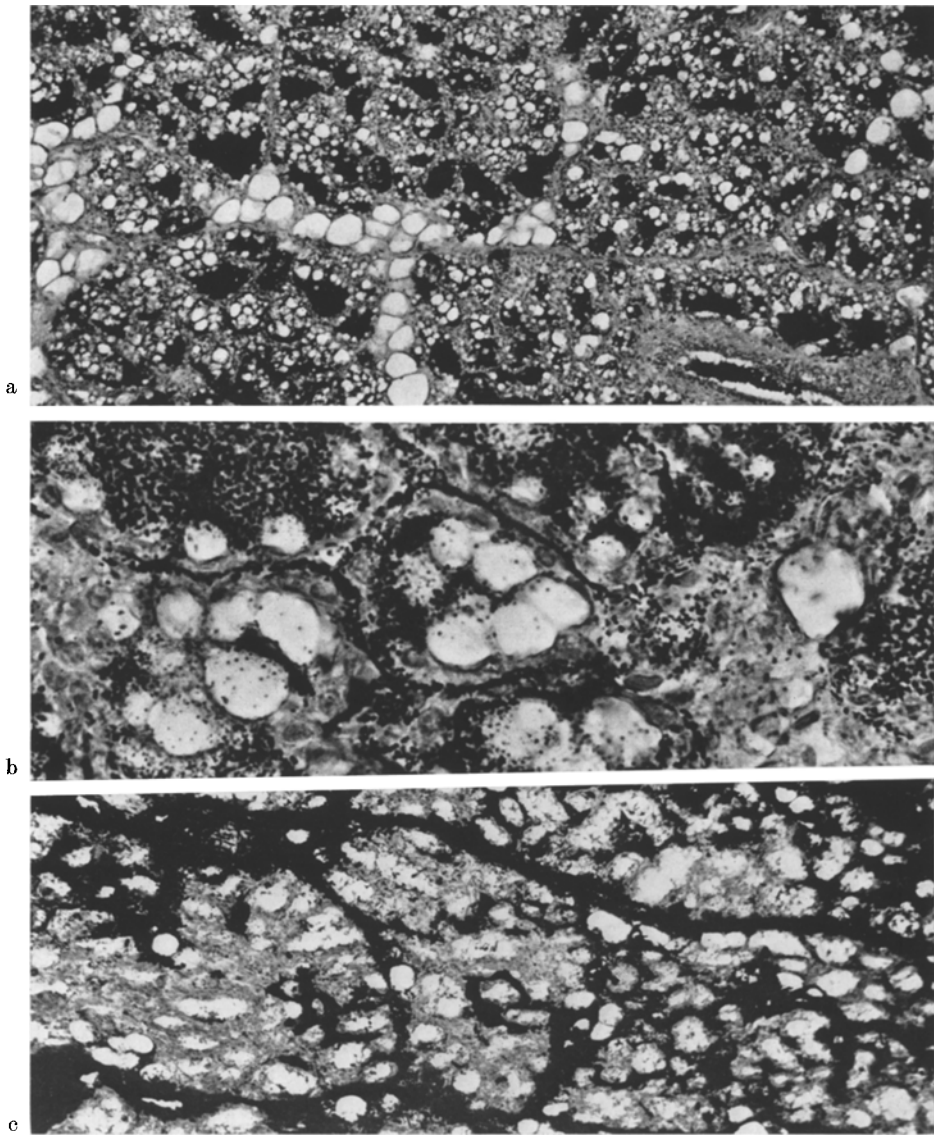


Abb. 5. a Lactation und Äthionin: Kalkausfällungen im sedimentierten Eiweiß, von Fett überlagert (sog. Spiegelbildung), Kossa, Vergr. $70\times$. Verkalkung nach DHT und Äthionin: b interstitielle Verkalkung um Drüsenalveolen. Durch Epithellücken ergießt sich kalkhaltiges (schwarzes) Sekret in das Interstitium, Kossa, Vergr. $70\times$. c Calcifikation des interstitiellen Bindegewebes der Brustdrüse, Kossa, Vergr. $70\times$. (Formol- und Alkohol-Fix., Paraff.)

Tieren ist dieser erhöht. Die Epithelzellen und das interstitielle Bindegewebe enthalten in kleinen Mengen ebenfalls Calcium, so daß sich bei voller Polarisation die Alveolarlumina unscharf abzeichnen.

Bei den Ratten mit „mittlerer Äthionindosis“ zeigt das Sekret im histologischen Bild ähnliche Zeichen der Entmischung wie bei niedriger Äthionindosis. Die

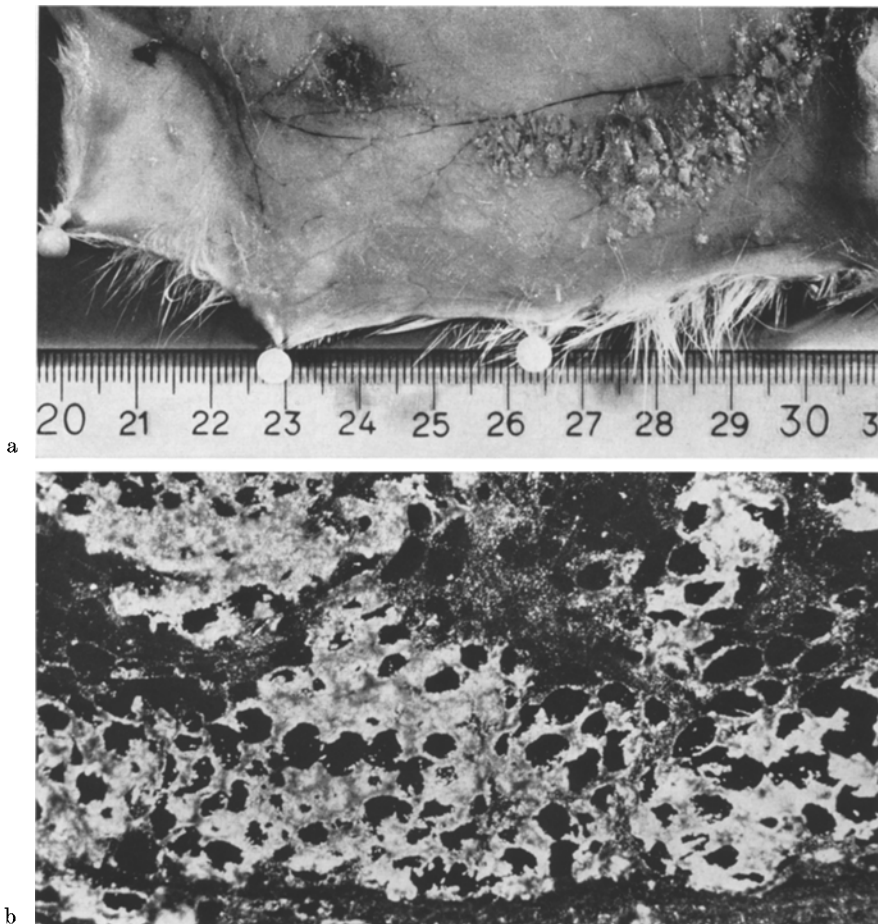


Abb. 6. a Schollige Verkalkung im atrophischen Brustdrüsengewebe der Ratte nach DHT und einmaliger Gabe einer hohen Äthionindosis. b Schollige, flächenhafte Verkalkung und Nekrose ganzer Drüsenläppchen nach DHT und Äthionin, Voigt-vollpolarisiert. (Alkohol-Fix., Paraff., Vergr. 70×)

Grenze zwischen Epithel und Sekret ist häufig unscharf: beide haben bei der HE-Färbung einen bläulichen Farbton. Beim Calciumnachweis nach Voigt erscheinen solche Stellen diffus mit Calcium angereichert. Sekret, Epithel und Interstitium ist mit Calcium beladen, wobei das Maximum der Calciumablagerungen im Sekret des Alveolenzentrums zu finden ist. Lokal sind die interstitiellen Kalkablagerungen verdichtet. Im interalveolären und periductulären Bindegewebe sind büschelförmige Kalkabscheidungen entstanden. Insgesamt liegt eine diffuse Calciumanreicherung des Drüsenkörpers vor.

Nach einmaliger Gabe der „hohen Äthionindosis“ verliert nach dreitägiger Versuchsdauer das Sekret in den weiten Alveolen seine homogene Beschaffenheit. Die bei HE-Färbung bläulichen Sekretmassen sedimentieren der Schwere nach und werden von Fetttropfen überlagert. Der Gehalt an Fetttropfen wird so hoch, daß

die übrigen Sekretbestandteile an den Alveolarrand gedrängt werden oder sich netzförmig dazwischen verteilen. In der Alveolenperipherie ist es oft nicht möglich, histologisch zwischen angefärbten Epithelien und dicht aufgelagertem Sekret zu unterscheiden. Nur bei sekretorisch tätigen Epithelzellen, die Fetttropfen abgeben, werden die Zellgrenzen deutlich. Kleinere Epithelgruppen werden nekrotisch, das Sekret wird nur durch die Basalmembran im Lumen gehalten. Im interstitiellen Bindegewebe sind die Fasern verquollen, es ist vermehrt eosinophil. Die PAS-Reaktion ergibt eine intensive Anfärbung des Interstitium.

Nach 20tägiger Beobachtung findet man größere Abschnitte der Brustdrüse umgebaut und von Kalkmassen durchsetzt.

Beim *Calciumnachweis* nach Voigt sind nach kurzer Versuchsdauer bei der hohen Dosierung die Alveolen gleichmäßig von kalkhaltigem Material erfüllt. Auch Epithel und Interstitium enthalten Calcium in diffuser Anordnung.

Mit zunehmender Entmischung des Sekretes durch Fetttropfenbildung wird das Alveolenzentrum calciumarm. Nur Reste von Eiweiß, die die Fetttropfen umschließen, enthalten Calcium. Dichte Kalkabscheidungen finden sich in den Sekretbestandteilen, die sich dem Epithel auflagern. Häufig sind kleine Kalkschollen in Drüsenepithelzellen zu beobachten. Stellenweise wird das Epithel von kalkhaltigem Sekret durchsetzt. Im angrenzenden interstitiellen Bindegewebe finden sich zunehmend streifenförmige Kalkabscheidungen entlang den Bindegewebsfasern (Abb. 5b). Es bilden sich massive interstitielle Verkalkungen in den Faserstrukturen und der Grundsubstanz aus, während im Alveolenlumen nur noch Reste calciumhaltiger Substanzen zu finden sind (Abb. 5c). In einem Teil der Alveolen kommt Epithel nicht mehr zur Darstellung. Statt der Drüsenepithelien finden sich lediglich schmale, ringförmige Kalkspangen, die dafür sprechen, daß auch intracelluläre Verkalkungen im Drüsenepithel eingetreten sind.

Nach 20tägiger Versuchsdauer sind in den erhaltenen Drüsenanteilen geringe interstitielle und intraalveoläre Kalkabscheidungen zu beobachten. In den zerstörten Anteilen der Drüse ist das Interstitium grobschollig verkalkt. An die alveoläre Struktur der Mamma erinnern dann nur noch ringförmig angeordnete Kalkspangen (Abb. 6b).

Diskussion

1. Physiologische Voraussetzungen

Bei der Beurteilung calciophylaktischer Reaktionen in der Mamma ist davon auszugehen, daß Drüsenalveolen und -gänge nur während der Lactation und im Beginn der Involution histochemisch erfaßbares Calcium enthalten. Dieses ist an die 200—300 m μ messenden Casein-granula gebunden, die im Golgfeld der Drüsenzellen aus Vorproteinen entstehen. Damit ist auch der Nachweis des intracellulären Calcium im polarisierten Licht nach Voigt während der Lactation oder Sekretretention zu erklären.

Bei schnell aufwachsenden Jungtieren, zu denen die Ratte zählt, ist der Milchcalciumgehalt höher als bei langsamer wachsenden Tieren (Tabelle).

Für die physiologische Erhaltung der Lactation ist ein gleichmäßiger Parathormonspiegel und ein konstanter Blutcalciumgehalt erforderlich (Cowie und Folley, 1961). Die Milchmenge nimmt nach Parathyreidektomie ab (Cowie und Folley, 1945). DHT bewirkt nach Djojosebaggio und Turner (1964) eine verstärkte Lactation und Serumcalcium-Mobilisation und in Kombination mit Geschlechtshormonen eine Stimulierung der Drüsenproliferation mit Erhöhung der DNS (v. Berswordt-Wallrabe und Turner, 1960). — Diese Einflüsse fügen sich bei einer regelrechten Lactation und Involution in die hormonalen Regulations- und Resorptionsmechanismen so ein, daß während der physiologischen Rückbildung der Mamma und vorüber-

gehenden Sekretretention keine Verkalkungen entstehen. — Dagegen kann bei DHT-Behandlung lactierender Tiere histochemisch ein eindeutig vermehrter Calciumgehalt der Milch beobachtet werden (Abb. 2). Diese Calciumanreicherung zeigt sich auch indirekt in einer vermehrten Calciumaufnahme der Jungtiere unter dem Bilde der unspezifischen Calcinose der Schädelhaut, des Herzmuskels und der Nieren.

2. Experimentelle Pathogenese intramammärer Verkalkungen

Die am Studium der experimentellen Calciphylaxie von Selye (1962) gewonnenen neuen Gesichtspunkte sind vor allem von Seifert (1963, 1965 a, b) für die Deutung verschiedener Formen extraossärer Organverkalkungen in der Pathologie des Menschen herangezogen worden. Die eigenen Untersuchungen an der Mamma sollten prüfen, ob calciphylaktische Reaktionen auch an diesem Organ ausgelöst werden können. Dabei wurde die Calcium-Homöostase durch perorale Instillation von DHT verändert und die Gewebescalcinose initiiert. Als *Realisator der Verkalkung* in der Brustdrüse diente die physikalische Wirkung der *Sekretretention* (Milchstauung) und als *chemischer Faktor* die *Zellschädigung durch Äthionin*.

Sekretstauungen in lactierenden Brustdrüsen und Retentionen bei verschiedenen Dysplasieformen werden häufig beobachtet und sind elektronenoptisch durch Strukturwandlungen des Sekretes und durch eine von Zeitdauer und Intensität der Stauung abhängigen Alteration der Drüsenepithelzelle gekennzeichnet (Bässler, 1961). Nach DHT-Sensibilisierung wird Calcium in das gestaute Sekret ausgeschieden. Unter zunehmender chemischer und physikalischer Änderung des Sekretes entwickeln sich Kondensate mit den Eigenschaften von Kristallisationskernen. Nach mehrtägiger Hypercalcämie lagern sich appositionell Kalksalze ab, die die starke intraalveoläre Verkalkungsform verständlich machen. Verkalkungen im Interstitium sind dagegen geringradig und nur dann zu erwarten, wenn der intraalveoläre Stauungsdruck zu einer Cytolyse des Epithels und nach Ruptur der Basalmembran zu einem Übertritt des Sekretes in das Stroma geführt hat (Abb. 3, 4).

In der Pathologie der menschlichen Brustdrüse sind diese intralobulären und intracanaliculären Verkalkungen häufig und als Calcifikation von retiniertem Sekret bei verschiedenen Dysplasieformen, insonderheit der fibrös-cystischen Mastopathie, aufzufassen. Es wird vermutet, daß Häufigkeit und Ausmaß dieser Verkalkungen auf der Fähigkeit der Drüsenzelle beruht, aktiv Calcium in höherer Konzentration als im Blutserum abzugeben (Black und Young, 1964; Hamperl, 1968). Im Hinblick auf den hohen Calciumspiegel physiologischer Sekretformen (Colostrum, Milch, vgl. Tabelle) und der häufig nachweisbaren Sekretion bei Dysplasien könnte diese eine Voraussetzung der Calcifikation darstellen. Der Realisationsfaktor wäre durch Stagnation, Viscositätsänderung und Kondensation des gebildeten Sekretes gegeben. Damit kann das physikalische Modell der Calciphylaxie diese Verkalkungsformen in der Brustdrüse des Menschen verständlich machen.

Calciphylaktische Reaktionen nach DHT und *metabolischer Zellschädigung* durch Äthionin sind bisher nicht untersucht worden und rufen ein anderes Verkalkungsmuster als durch Sekretstauungen hervor. Das als Challenger verwendete Äthionin hemmt nach Simpson, Farber und Tarver (1950) die intracelluläre Eiweißsynthese, indem Methionin nicht in das Proteinmolekül eingebaut wird und ein „abnormes“ Eiweiß entsteht (Levine und Fopeano, jr., 1953). Von Becker

Tabelle. *Milchcalciumgehalt verschiedener Species**Ratte* (nach Luckey, Mende und Pleasans, 1954)

1. Lactationstag (Colostrum)	99 mg-%
3.—6. Lactationstag	225 mg-%
13.—17. Lactationstag	275 mg-%
20.—23. Lactationstag	237 mg-%

Mensch

Colostrum	48,1 mg-%
Transitorische Milch	46,4 mg-%
Reife Milch	34,4 mg-%
Blutcalcium	10,0 mg-%

Esel	90 mg-%
Büffel	180 mg-%
Rind	120 mg-%
Schaf	190 mg-%
Pferd	100 mg-%
Schwein	270 mg-%
Ziege	170 mg-%

(Nach Ling, Kon und Porter, 1961)

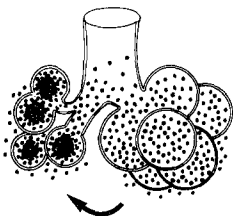
(1957) und später von Reichelt (1966) ist über die vielfältigen biochemischen und morphologischen Wirkungen berichtet worden. Ähnlich wie die Parenchymzellen des Pankreas (Seifert und Gieseking, 1961; Herman und Fitzgerald, 1962a, b) zeigen die der Eiweißsynthese dienenden Organellen in den Drüsenzellen der Mamma dosis- und zeitabhängige Alterationen. Diese sind vor allem durch einen Verlust an Ribosomen, durch Entstehung eines agranulären Ergastoplasma, durch Auflockerung der Kernstruktur mit Vacuolenbildung und Membrandefekten und durch eine versiegende Caseinsynthese gekennzeichnet (Bässler und Grillmaier, 1962; Grillmaier und Bässler, 1963). — In der lactierenden Mamma führt Äthionin schon nach 10stündiger Wirkungsdauer zu einer Vermehrung des intraalveolären, histochemisch erfaßbaren Calciums. Dabei könnte diese Zunahme des Calciumgehaltes durch eine gesteigerte Calciumsekretion oder durch verminderte Calcium-Proteinbindung bei relativem Calciumüberschuß zu erklären sein.

Die gemeinsame Wirkung von DHT und Äthionin löst neben einer lang anhaltenden Hypercalcämie (Jean und Mendell, 1962; Schäfer, 1968) eine Steigerung der Permeabilität (Gerlach und Themann, 1965) und metabolische Zellschäden aus. Diese Funktionsstörungen äußern sich histopathologisch neben einer Calciumreicherung im Sekret nun auch in einer zunehmenden Calciumaufnahme im Epithel. Die durch Äthionin vorgeschädigten Zellorganellen stellen die Matrix der intracellulären Verkalkungen dar, die sich lichtoptisch bis zu einer gänzlichen Inkrustation des Epithelverbandes verdichten können. Die metabolischen Zellschäden, Nekrobiosen und Zellnekrosen ermöglichen ein Abfließen des calciumreichen Drüsensekretes in das interlobuläre Bindegewebe, so daß hier gewebliche Voraussetzungen einer interstitiellen Calcifikation gegeben sind. Diese Form einer calciophylaktischen Reaktion durch Äthionin mit einer örtlichen Störung des Zell- und Gewebstoffwechsels würde der als „dystrophische Verkalkung“ bezeichneten Form zuzuordnen sein.

In der Brustdrüse des Menschen werden auch Verkalkungen im Stroma und in den Epithelzellen beobachtet. Im Stützgewebe lokalisierte, grobe Kalkschollen treten bei fibrös-cystischer Mastopathie, bei Carcinomen, gelegentlich auch in Fibroadenomen und im hyalinisierten Kapselgewebe gutartiger Tumoren auf (Geschickter, 1946; Hamperl, 1968). Pathogenetisch können diese mesenchymalen Calcifikationen zu einem großen Teil auf eine celluläre Störung und Aufhebung der Epithel-Bindegewebsgrenze zurückgeführt werden. Dadurch wird es möglich, daß Cysteninhalte bei Mastopathien oder gebildete Sekrete in Geschwülsten in das Stroma gelangen und durch physikalisch-chemische Alterationen der Grundsubstanz Voraussetzungen für eine Verkalkung schaffen.

Typen calciphylaktischer Reaktionen der Mamma

a) *mechanischer Faktor*
Sekretstauung
Calcifikation überwiegend
intraalveolär



b) *metabolischer Faktor*
Zellschädigung durch Äthionin
Calcifikation überwiegend
interstitiell

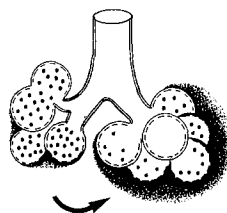


Abb. 7 a und b. Schema zur Pathogenese und Morphologie der experimentell erzeugten Verkalkungstypen

In Abb. 7 ist schematisch Pathogenese und Morphologie der zwei experimentell durch unterschiedliche Challenger erzeugten Verkalkungstypen in der Mamma aufgezeigt worden. Damit können die einleitend aufgeworfenen Fragen beantwortet werden:

1. Bei der durch *mechanische Sekretstauung* ausgelösten lokalen *Calciphylaxie* ist die Kalkablagerung überwiegend im Drüsenlumen lokalisiert. Die Verkalkungsmatrix ist das retinierte Sekret.

2. Die *metabolische*, durch Äthionin induzierte *Calciphylaxie* ist durch intraepitheliale und quantitativ überwiegend durch interstitielle Verkalkungen charakterisiert. Als Verkalkungsmatrix dienen metabolisch geschädigte Epithelzellen und Zellorganellen und das die Drüsenläppchen umgebende Mesenchym.

Literatur

- Bässler, R.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen bei experimenteller Milchstauung. Frankfurt: Z. Path. **71**, 398—422 (1961).
— Grillmeier, H.: Der Einfluß von Äthionin auf Struktur und Funktion der Milchdrüse. Beitr. path. Anat. (Jena) **127**, 1—24 (1962).
Becker, V.: Zur Wirkungsweise und praktische Bedeutung der sog. Antimetabolite. Untersuchungen über die Aminosäure Äthionin. Dtsch. med. Wschr. **82**, 221—225 (1957).

- Berswordt-Wallrabe, R. v., Turner, W. C.: Dihydrotachysterol (AT 10) and mammatogenesis in ovary-thyroid-parathyroidectomized rats. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **104**, 599—602 (1960).
- Black, J. W., Young, B.: A radiological and pathological study of the incidence of calcification in disease of the breast and neoplasms of other tissues. *Brit. J. Radiol.* **38**, 596—598 (1965).
- Buchwald, W.: Die röntgenologische, thermometrische und nuklearmedizinische Diagnostik von Erkrankungen der weiblichen Brustdrüse. *Habil.-Schrift Mainz* 1969.
- Cowie, A. T., Folley, S. J.: Parathyroidectomy and lactation in the rat. *Nature (Lond.)* **156**, 719—721 (1945).
- — The mammary gland and lactation in: *Sex and internal secretions*, vol. II., edit. by W. C. Young and G. W. Corner. Baltimore 1961.
- Djojoseobagio, S., Turner, W. C.: Effects of parathyroid extract, dihydrotachysterol (Hytakerol) and calciferol on milk secretion in rats. *Endocrinology* **74**, 554—558 (1964).
- Egan, R. L.: Experience with mammography in tumor institution: Evaluation of 1.000 studies. *Radiology* **75**, 894—900 (1960).
- Friedmann, A. K., Askovitz, S. J., Berger, S. M.: A co-operative evaluation of mammography in seven teaching hospitals. *Radiology* **86**, 886—891 (1966).
- Gerlach, U., Themann, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der metastatischen Calcifizierung. *Klin. Wschr.* **43**, 1262—1268 (1965).
- Gershon-Cohen, J., Yiu, L. S., Berger, S. M.: The diagnostic importance of calcareous patterns in roentgenography of breast cancer. *Amer. J. Roentgenol.* **88**, 1117—1125 (1962).
- Geschickter, Ch. F.: *Diseases of the breast*, 2nd edit. Philadelphia-London-Montreal 1945.
- Grillmeier, H., Bässler, R.: Die Wirkung parenteraler Methionin- und Äthioningaben auf die Laktation der Ratte. Biometrische, chromatographische, licht- und elektronenoptische Studien. *Z. ges. exp. Med.* **137**, 299—320 (1963).
- Hamperl, H.: Zur Frage der pathologisch-anatomischen Grundlagen der Mammographie. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **28**, 901—917 (1968).
- Herman, L., Fitzgerald, P. J.: a) The degenerative changes in pancreatic acinar cells caused by d, l-ethionine. *J. Cell Biol.* **12**, 277—296 (1962). b) Restitution of pancreatic acinar cells following ethionine. *J. Cell Biol.* **12**, 297—312 (1962).
- Jean, P., Mendell, P.: Calcium et phosphore sérique au cours de la production d'une calcinose cutanée par un dérivé de la vitamine D. *Rev. canad. Biol.* **21**, 17—22 (1962).
- Kossa, J. v.: Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beitr. path. Anat. (Jena)* **29**, 163—202 (1901).
- Levine, M., Fopeano J. V. Jr.: Effect of ethionine on protein content of liver in growing rats. *J. biol. Chem.* **202**, 597—605 (1953).
- Levitan, L. H., Witten, D. M., Harrison, E. G. Jr.: Calcification in breast diseases: Mammographic-pathologic correlation. *Amer. J. Roentgenol.* **92** (1), 29—39 (1964).
- Ling, E. R., Kon, S. K., Porter, I. W. G.: The composition of milk and the nutritive value of its components in milk: the mammary gland and its secretion, edit. by S. K. Kon and A. T. Cowie, vol. II. New York and London 1961.
- Luckey, Th. D., Mende, T. J., Pleasants, J.: The physical and chemical characterisation of rat's milk. *J. Nutr.* **54**, 345—359 (1954).
- Moss, M. J., Urist, M. R.: Experimental cutaneous calcinosis. *Arch. Path.* **78**, 127—133 (1964).
- Reichelt, A.: Der Einfluß von Äthionin auf die enchondrale Ossifikation der Ratte. *Frankfurt: Z. Path.* **76**, 41—51 (1966).
- Richardson, K. C.: Some structural features of the mammary tissues. *Brit. med. Bull.* **6**, 123—129 (1948).
- Schäfer, H.—J.: Zur Pathogenese der calciphylaktischen Lungenfibrose. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **344**, 21—39 (1968).
- Schultz-Brauns, O.: Die Geschwülste der Brustdrüse. In: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, hrsg. v. O. Lubarsch, und F. Henke, Bd. VII. Berlin: Springer 1933.

- Seifert, G.: Experimentelle Kalziphyllaxie der Speicheldrüsen nach Einwirkung von Dihydrotachysterin und Serotonin. Frankfurt: Z. Path. **72**, 531—547 (1963).
- Die calciphyllaktische Pankreatitis. Virchows Arch. path. Anat. **338**, 319—331 (1965 a).
- Verkalkung und Calciphyllaxie. Dtsch. med. Wschr. **90**, 2334—2339 (1965 b).
- Giesecking, R.: Elektronenmikroskopische Befunde am Rattenpankreas nach experimenteller Äthioninschädigung. Beitr. path. Anat. (Jena) **124**, 81—107 (1961).
- Selye, H.: Calciphyllaxis. Chicago: Chicago University Press 1962.
- Shepard, T. J., Crile, G., Strittmatter, W. C.: Roentgenographic evaluation of calcification seen in paraffin block specimens of mammary tumors. Radiology **78**, 967—969 (1962).
- Simpson, M. V., Farber, E., Tarver, H.: Studies on ethionine: Inhibition of protein synthesis in intact animals. J. biol. Chem. **182**, 81—89 (1950).
- Voigt, G. E.: Ein neuer histotopochemischer Nachweis des Calcium (mit Naphthalhydroxamsäure) Acta histochem. (Jena) **4**, 122—131 (1957).

Prof. Dr. R. Bässler
Pathologisches Institut d. Univ.
65 Mainz
Langenbeckstr. 1